

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan bersifat eksperimental. Dengan menggunakan variabel penelitian ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjung Karang. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juni 2022

C. Subyek penelitian

Subyek penelitian ini yaitu daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) yang diperoleh di daerah Payungrejo, RT/RW 010/00, Pubian, Lampung Tengah, kriteria daun sambung nyawa yang masih segar dan berwarna hijau dengan lebar daun 6,5 cm dan panjang 16,5 cm diambil pada tanaman sambung nyawa. Daun sambung nyawa dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan dan yang tidak di encerkan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai larutan uji. Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408 diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Jumlah perlakuan daun sambung nyawa sebanyak 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Ekstrak daun sambung nyawa (<i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr.)	Daun sambung nyawa yang sudah di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% lalu dilakukan pengenceran dengan berbagai konsentrasi.	Pengenceran dengan rumus : $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	Ekstrak daun sambung nyawa dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%.	Interval
2	Pertumbuhan bakteri <i>Salmonella typhi</i> ATCC 1408	Bakteri <i>Salmonella typhi</i> yang pertumbuhannya akan dihambat oleh ekstrak daun sambung nyawa.	Diameter zona hambat	Jangka sorong	Diameter zona hambat (mm)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Pemeriksaan

- a. Determinasi daun sambung nyawa
- b. Pembuatan simplisia daun sambung nyawa.
- c. Ekstraksi daun sambung nyawa dengan metode maserasi.
- d. Peremajaan bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 1408.
- e. Identifikasi bakteri *Salmonella typhosa* ATCC 1408.
- f. Pembuatan larutan uji.
- g. Pengujian ekstrak daun sambung nyawa terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408.
- h. Pengukuran zona hambat.

2. Metode Pemeriksaan

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang kemudian dilakukan evaporasi. Pada penelitian ini metode pemeriksaan uji daya hambat yang digunakan yaitu metode difusi agar dengan cara Kirby Bauer.

3. Alat dan Bahan

- a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, tabung reaksi, rak tabung reaksi, petridist, lidi kapas steril, pinset, mixer vortex, inkubator, autoklaf, oven, neraca analitik, erlenmayer, pipet ukur, vacuum pump, ose, disk cakram, kapas, beaker glass, kertas kopi, jangka sorong, hot plate, korek api, handscoon, masker, lampu spirtus, wadah sampel, botol gelap, dan corong gelas.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larutan ekstrak daun sambung nyawa dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%, aquades steril, NaCl fisiologis (0,85%) steril, stok bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408, kontrol negatif aquades steril, dan kontrol positif antibiotik klorampenikol 30 µg.

c. Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini meliputi media Muller Hinton Agar, media Nutrient Broth, media Nutrient Agar Slant.

4. Cara Kerja

a. Persiapan dan Determinasi Daun Sambung Nyawa

Daun sambung nyawa diperoleh dari sekitaran rumah yang berada di daerah desa Payungrejo, Pubian, RT/RW 001/03, Pubian, Lampung Tengah. Kemudian daun sambung nyawa di detrmnisi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Dengan cara mencocokkan morfologi yang ada pada daun sambung nyawa terhadap kepustakaan dan dibuktikan dibidang Botani Lampung Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b. Pembuatan Simplisia

- 1) Daun sambung nyawa, diambil sebanyak 5 kg dalam kondisi yang masih segar, dengan ukuram lebar daun 6,5 cm dan panjang daun 16,5 cm.
- 2) Daun sambung nyawa dicuci di air mengalir lalu kemudian di potong kecil-kecil.

- 3) Daun yang telah di potong di keringkan dibawah sinar matahari, selama pengeringan daun sambung nyawa di tutup dengan menggunakan kain berwarna hitam.
 - 4) Daun sambung nyawa yang telah kering kemudian dihaluskan dan diayak agar mendapatkan serbuk yang benar-benar halus.
 - 5) Serbuk daun sambung nyawa disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.
- c. Proses Pembuatan Ekstrak dengan menggunakan metode maserasi
- 1) Ditimbang serbuk kering daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.)Merr.) sebanyak 500 gram, dimasukkan ke dalam wadah maserasi.
 - 2) Kemudian ditambahkan 3.500 ml etanol 96% sampai semua serbuk daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.)Merr.) terendam larutan tersebut dan diamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
 - 3) Hasil maserasi disaring untuk memisahkan cairan etanol dengan ampasnya dan dihasilkan ekstrak cair.
 - 4) Ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.)Merr.) diuapkan menggunakan *rotatory evaporator* untuk memperoleh ekstrak kental.
(Marjoni, 2016)
- d. Sterilisasi Alat.
- Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas coklat. Disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit (Soemarno, 2000).
- e. Pembuatan media Nutrien Broth
- Media Nutrient Broth ditimbang sebanyak 0,08 gram dan dimasukkan kedalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan 10 ml aquades, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil lalu dipanaskan di atas hotplate sampai larut, setelah larut masukan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 ml untuk masing-masing tabung, kemudian tutup tabung dengan kapas dan di sterilkan didalam autoclave dengan suhu 121°C 1 atm selama 15 menit. Media dapat disimpan dalam lemari pendingin jika belum digunakan dapat dimasukkan ke dalam lemari pendingin (Artanti 2018).

b. Pembuatan media Muller Hinton Agar

Media Muller Hinton Agar ditimbang sebanyak 22,8 gram dan dimasukkan kedalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan menggunakan 60 ml aquades, ditutup dengan kapas yang dibungkus aluminium foil lalu dipanaskan di atas hotplate sampai larut. Setelah media larut lakukan sterilisasi media dengan menggunakan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C 1 atm. Kemudian tuang media MHA kedalam petridish steril dengan cara aseptik, homogenkan dengan membentuk angka delapan, dan diamkan sampai memadat, jika media belum akan digunakan dimasukkan kedalam lamari pendingin dengan suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ (Artanti 2018).

c. Pembuatan larutan Mac Farland

Larutan Barium Chloride Dihydrate ($\text{BaCl}_2\text{H}_2\text{O}$) 1% sebanyak 0,5 ml dicampur dengan larutan asam sulfat 1% sebanyak 99,5 ml. Kemudian dimogenkan lalu setelah homogen standar kekeruhan in dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditutup rapat agar tidak terjadi penguapan. Kekeruhan standar Mac Farland 0,5 diukur dengan menggunakan alat turbidimeter. Setiap akan digunakan dikocok terlebih dahulu (Soemarno, 2000).

f. Identifikasi bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408.

1) Hari pertama

a) Pengecatan Gram

- (1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- (2) Bersihkan objek glass dengan menggunakan alkohol, kemudian tunggu hingga kering.
- (3) Setelah itu diberi tanda lingkaran dengan menggunakan spidol.
- (4) Teteskan 1 tetes NaCl dan diberi bakteri dari strai lalu dihomogenkan.
- (5) Objek glass yang sudah ada bakteri di fiksasi diatas spirtus.
- (6) Setelah difiksasi kemudian genangi preparat dengan menggunakan larutan cat Gram A sampai menutupi seluruh bagian preparat biarkan selama 1 menit dan di cuci dengan air mengalir.
- (7) Genangi dengan Gram B selama 1 menit, bilas dengan air mengalir.
- (8) Larutkan warnanya dengan menggenangi sediaan dengan Gram C selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir.

(9) Genangi dengan Gram D selama 30 detik, cuci dengan air mengalir.

(10) Keringkan dan preparat siap diamati dibawah mikroskop.

b) Penanaman bakteri pada media Mac Concey agar, Endo agar, Salmoella-Shigella agar. Eosin Methylen Blue

(1) Bakteri ditanam di media Mac Concey agar, Endo agar, Salmoella-Shigella agar. Eosin Methylen Blue.

(2) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Diperoleh hasil pengecatan Gram : bakteri berbentuk basil, berwarna merah, bersifat Gram negatif.

2) Hari kedua

a) Diamati pertumbuhan bakteri yang telah tumbuh pada penanaman hari pertama pada media Mac Concey agar, Endo agar, Salmoella-Shigella agar, Eosin Methylen Blue, dan Media Bismuth Sulfit Agar.

b) Dari koloni tersangka dilakukan pengecatan Gram

c) Ditanam pada media biokimia yaitu Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Simmon's Citrate agar (SC), SIM (Sulfur Indol Motility), MrVp, Urea, dan pada media gula-gula yaitu Glukosa, Laktosa, Maltosa, Manitol, Sukrosa.

d) Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Dari hasil identifikasi hari kedua pada media plate diperoleh hasil :

Media BSA : Koloni bakteri *Salmonella typhi* pada media Bismuth Sulfit Agar menghasilkan koloni kecil, terdapat zona hitam, smooth, keeping, kadang-kadang koloni kelihatan hitam saja.

Media MC : Koloni bakteri *Salmonella typhi* pada media Mac Concey menghasilkan Koloni tidak berwarna, jernih keeping, sedang, bulat, smooth.

Media Endo : Koloni bakteri *Salmonella typhi* pada media Endo Agar menghasilkan Koloni tidak berwarna, ukuran sedang, keeping, smooth.

Media SSA : Koloni bakteri *Salmonella typhi* pada media Salmonella Shigella menghasilkan Koloni tidak berwarna, ukuran kecil-kecil, keeping, smooth, bulat.

Media EMB : Koloni bakteri *Salmonella typhi* pada media Eosin Methylene Blue menghasilkan Koloni tidak berwarna, ukuran sedang, keping, smooth, bulat.

3) Hari ketiga

a) Amati pertumbuhan bakteri yang telah tumbuh pada penanaman di hari kedua pada media biokimia yaitu Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Simmon's Citrate agar (SC), SIM (Sulfur Indol Motility), MrVp, dan pada media gula-gula yaitu Glukosa, Laktosa, Maltosa, Manitol, Sukrosa.

b) Cocokkan hasil pengamatan dengan ciri identifikasi dari *Salmonella typhi*.

Dari hasil identifikasi hari ketiga maka diperoleh :

Media TSIA : L/D :M/K

H₂S : +

Gas : -

Media SC : +

Media SIM : Sulfur : +

Indol : -

Motility : +

Media MrVp : Mr : +

Vp : -

Media Glukosa : +/g(-)

Media Laktosa : -/g(-)

Media Manitol : +/g(-)

Media Maltosa : +/g(-)

Media Sukrosa : -/g(-)

g. Pembuatan Suspensi Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408

Bakteri dibiakkan dalam media Nutient Broth (NB), dan di inkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C. Samakan kekeruhan antara media Nutrient Broth dengan larutan standar Mac Farland 0,5 ml. Jika suspensi terlalu keruh ditambahkan dengan NaCl 0,85% atau jika suspensi terlalu jernih maka ditambahkan dengan menggunakan koloni sampai kekeruhannya sama dengan larutan atandar Mac Farland 0,5 ml

h. Pembuatan larutan uji

Rumus pengenceran :

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan : V_1 = volume larutan uji yang dipipet (ml) $\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%) V_2 = volume larutan uji dengan aquadest steril (ml) $\%_2$ = Konsentrasi yang akan dibuat (100%)

Tabel 3.2 Konsentrasi Pengenceran Ekstrak Daun Sambung Nyawa.

Konsentrasi (%)	Volume ekstrak daun sambung nyawa (ml)	Volume aquadest steril (ml)	Volume larutan (ml)
10%	0,5	4,5	5
20%	1	4	5
30%	1,5	3,5	5
40%	2	3	5
50%	2,5	2,5	5
60%	3	2	5
70%	3,5	1,5	5
80%	4	1	5
90%	4,5	0,5	5
100%	5	0	5

i. Uji Daya Hambat

Menggunakan metode difusi Kirby Bauer.

- 1) Siapkan media MHA yang sudah memadat.
- 2) Masukkan lidi kapas steril kedalam suspensi bakteri media Nutrient Broth yang kekeruhannya telah di standarisasi dengan Mac Farland 0,5. Tunggu sebentar supaya cairan dapat meresap kedalam kapas. Kemudian lidi kapas dapat diangkat dan diperas dengan menekankan pada dinding tabung bagian dalam sambil memutar lidi kapas.
- 3) Kemudian pulas lidi kapas ke permukaan media Muller Hinton Agar. Semua permukaan media dipulas dengan bakteri. Biarkan media MHA yang sudah dipulas selama 5 menit agar suspensi meresap ke dalam media agar.
- 4) Rendam disk blank pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun sambung nyawa selama 15 menit, kemudian ambil dengan pinset steril dan ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah di pulas dan di beri jarak 15 mm antar disk. Disk ditekan dengan menggunakan pinset steril

pada permukaan agar, sehingga terjadi kontak yang baik antara disk dengan permukaan media.

- 5) Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Diameter zona hambat yang diukur yaitu zona jernih disekitar disk (tidak ada pertumbuhan bakteri) menggunakan jangka sorong.
- 7) Diameter zona hambat yang terbentuk merupakan kemampuan ekstrak daun sambung nyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara

- b. Dilakukan pengujian efektivitas daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408.
- c. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan mm.
- d. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam tabel.

2. Analisis Data

Analisa data digunakan dengan Rancangan Acak Lengkap Non Faktorial untuk melihat kemampuan ekstrak daun sambung nyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 1408.